UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Biologia reprodutiva das *Ionopsis* Kunth (Orchidaceae) do Brasil

João Marcelo Robazzi Bignelli Valente Aguiar

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Biologia reprodutiva das *Ionopsis* Kunth (Orchidaceae) do Brasil

João Marcelo Robazzi Bignelli Valente Aguiar

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada

Orientador: Emerson Ricardo Pansarin

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Aguiar, João Marcelo Robazzi Bignelli Valente
Biologia Reprodutiva das *Ionopsis* Kunth
(Orchidaceae) do Brasil. Ribeirão Preto, 2014.
63 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de
concentração: Biologia Comparada
Orientador: Emerson Ricardo Pansarin

1. Epidendroideae. 2. Fragrância floral. 3. Anatomia floral.
4. Oncidiinae. 5. Polinização.

Agradecimentos

Várias pessoas merecem estar presentes nessa seção pelo seu apoio ao longo desse trabalho. Todas foram fundamentais para o seu desenvolvimento e para a minha formação. A todos agradeço imensamente. Em especial, agradeço:

Ao Prof. Dr. Emerson Ricardo Pansarin, por mais uma vez ter confiado em mim e me orientado com dedicação e paciência.

À Dra. Ludmila Mickeliunas Pansarin minha co-orientadora extra-oficial pelo imensurável auxílio ao longo dessa pesquisa e da minha formação.

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo, por ter aberto as portas do seu laboratório para as nossas análises de fragrância. Agradeço aqui também sua aluna Maria Elvira por todo o auxílio na preparação das amostras e identificação dos compostos.

Ao Sr. Alvino, por ter me recebido em sua casa e me mostrado um pouco da biodiversidade das orquídeas da Amazônia.

Aos amigos do laboratório: Bruno (Tolima), Carol, Bruno, Paulo e, mais recentemente, Evelyn e Luciano, por proporcionarem sempre conversas agradáveis e discussões interessantes.

À minha mãe, que esteve ao meu lado em mais uma etapa da minha vida, me mostrando sempre que sou capaz de alcançar meus objetivos e que desistir nunca é a melhor opção.

À minha irmã, Júlia, cada vez mais presente a minha vida, me ensinando que é possível fazer parte do que acontece com quem é importante para nós, mesmo estando tão longe.

Às minhas avós, Lúcia e Luiza, pelos conselhos tão valiosos que carrego comigo sempre.

A todos os membros da minha família, por formarem as bases do meu crescimento como pessoa.

À Marina (Queija, Amor, Princesa), pela paciência e carinho em todos os momentos fáceis e difíceis e também pelas broncas, quando necessárias. Também agradeço por ter me ajudado a me conhecer melhor e me fazer mais feliz a cada dia que passamos juntos.

Ao Dr. Bruno, meu irmão de coração, parceiro de todos os momentos e grande amigo de longa data.

Às grandes amigas Fefaum, Bibão, Dodô, Aninha e Lú, sempre presentes nas minhas melhores memórias.

Ao Mixirica, tanto pela ajuda nas coletas e discussões científicas, quanto pela amizade e companheirismo.

Às meninas Tila, Baby, Nê e também ao Leo, pela amizade e por terem me recebido de portas e braços sempre abertos.

Aos especiais Pamonha, Mulan, Mestre e Cupu, que são aqueles amigos que eu sei que vou levar para sempre.

A todos os meus amigos da graduação com quem mantenho contato até hoje e que nunca me deixam esquecer dos momentos bons que passamos juntos.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Biologia da FFCLRP, em especial àqueles que compõem o Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao longo do Mestrado.

*O jardineiro mestre ali é a natureza,
o homem apenas é guarda, observador e aluno.*

Frederico Carlos Hoehne

Sumário

Resumo	9
Abstract	11
Introdução Geral	13
Capítulo 1. Osmóforos e compostos voláteis florais das <i>Ionopsis</i> Kunth (Orchidaceae) brasileiras	17
Resumo	18
Abstract	19
Introdução	20
Materiais e Métodos	21
Resultados	23
Discussão	24
Agradecimentos Específicos	27
Referências Bibliográficas	28
Tabela	33
Legendas das Figuras	36
Figuras	37
Capítulo 2. Biologia reprodutiva de <i>Ionopsis utricularioides</i> (Sw.) Lindl.: uma orquídea de ampla distribuição polinizada por engano de néctar	39
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Materiais e Métodos	43
Resultados	45
Discussão	47
Agradecimentos Específicos	51
Referências	51
Tabelas	55

Legenda da Figura	57
Figura	58
Considerações Finais	59
Referências Bibliográficas	61

Resumo

O gênero *Ionopsis* Kunth (Orchidaceae) apresenta seis espécies epífitas distribuídas ao longo do continente americano, incluindo o Caribe, e também nas ilhas de Galápagos. Neste trabalho foram estudadas a anatomia e histoquímica das estruturas secretoras, e caracterizadas as fragrâncias florais das espécies brasileiras de *Ionopsis*: *I. satyrioides* e *I. utricularioides*. A identificação dos componentes químicos das fragrâncias florais de ambas as espécies foi realizada a partir de análises por GC-MS. Além disso, observações de campo foram realizadas para investigar a polinização de *I. utricularioides* e identificar seus polinizadores. Foram realizados os tratamentos de autopolinização manual, autopolinização espontânea, polinização cruzada e emasculação para caracterizar o sistema reprodutivo da espécie. Plantas foram marcadas como controle no campo para determinar a taxa de frutificação natural. Para *I. utricularioides* os dados de frutificação obtidos foram comparados com o que é descrito na literatura para populações de Porto Rico. Também foram determinadas a porcentagem de sementes viáveis nos frutos formados pelos tratamentos e em condições naturais. Além disso, *I. utricularioides* foi investigada com vermelho neutro para determinar se há produção de néctar no cálcio presente nas flores da espécie. Foram encontrados osmóforos em ambas as espécies de *Ionopsis* estudadas. *Ionopsis satyrioides* possui osmóforos nas protuberâncias na base do labelo, que pode ser caracterizado por uma epiderme de células arredondadas que produz uma fragrância composta principalmente por farnesol. Por outro lado, *I. utricularioides* possui um osmóforo papiloso na região das protuberâncias, além das células epidérmicas arredondadas presentes nas protuberâncias, produzindo uma fragrância com ocimeno ou pentadecan-2-ona como o principal constituinte, de acordo com a população analisada. As espécies puderam ser distinguidas de acordo com as suas fragrâncias. *Ionopsis utricularioides* é polinizada exclusivamente por abelhas, que são atraídas por engano. O polinário fica aderido à porção dorsal da probóscide. Os tratamentos manuais de polinização revelaram que as populações brasileiras de *I. utricularioides* são auto-incompatíveis e produzem menos frutos que as caribenhas em condições naturais. Os frutos apresentaram uma taxa de 99% de sementes viáveis. De acordo com a Lei de Baker, organismos autocompatíveis são favorecidos pela seleção natural em ambientes isolados como ilhas. Considerando um evento de dispersão associado a

um efeito *bottleneck*, um pequeno número de indivíduos autocompatíveis de *I. utricularioides* pode ter sido selecionado ao colonizar a ilha de Porto Rico.

Palavras-chave: Epidendroideae, fragrância floral, anatomia floral, polinização, Oncidiinae

Abstract

Ionopsis Kunth (Orchidaceae) presents six epiphytic species distributed throughout the Americas and also at the Galapagos Islands and the Caribbean Islands. This study investigated the anatomy and histochemistry of the secretory structures, and characterized the floral fragrances of *I. satyrioides* and *I. utricularioides*. Also, it was studied in details the floral and reproductive biology of *I. utricularioides* at the São Paulo state interior, Brazil. Chemical compounds of the flower fragrances were identified with GC-MS analysis. Field observations were made to investigate the pollination of *I. utricularioides* and identify its pollinators. It were performed the treatments of manual self-pollination, spontaneous self-pollination, cross-pollinations and emasculation to establish the reproductive system of the species. Plants were kept as controls in their natural habitats in order to define the fruit set. Fructification data were compared with the existing literature data for the Puerto Rico populations. It was also determined the percentage of viable seeds in all of the fruits formed by the treatments and also for those formed in natural conditions. Additionally, for *I. utricularioides*, it was performed a neutral red test to investigate if there is nectar production at the spur present at the species flowers. It was found osmophores in both of the *Ionopsis* species studied. *Ionopsis satyrioides* possesses osmophores at the protuberances at the base of the lip, which can be characterized by an epidermis with rounded cells, which produces a fragrance mainly composed by farnesol. On the other hand, *I. utricularioides* possesses a papillose osmophore at the protuberances region in addition to the odor producing rounded cells of the protuberances epidermis, producing a fragrance with ocimene or pentadecan-2-one as the major compound. The species can be distinguished according to their fragrances. In the Southeastern Brazil, *I. utricularioides* flowers from July to October. The species is pollinated exclusively by bees that are attracted by food deceit. The pollinarium gets attached to the dorsal portion of the bee's proboscis, while they insert their head in the flowers searching for nectar. The manual pollination treatments revealed that the Brazilian populations of *I. utricularioides* are self-incompatible and produces less fruits in natural conditions than the self-compatible Caribbean populations. The fruits present 99% of viable seeds. According to Baker's Law, self-compatible organisms are favored by natural selection in isolated environments, such as islands. Taking in consideration a dispersion event

associated with bottleneck effect, a small number of self-compatible individuals of *I. utricularioides* could have been selected while colonizing the Puerto Rico Island.

Key-words: Epidendroideae, floral fragrance, floral anatomy, pollination, Oncidiinae

Introdução Geral

Orchidaceae apresenta mais de 24.000 espécies distribuídas em cerca de 800 gêneros sendo considerada a maior família entre as plantas com flores (Dressler 2005). As orquídeas podem ser encontradas em todos os continentes, exceto a Antártica (Fay & Chase 2009). No Brasil, podem ser encontradas por volta de 2.500 espécies em 240 gêneros (Barros *et al.* 2014), ocorrendo em todas as formações vegetacionais brasileiras (Hoehne 1949).

A maioria das espécies de orquídeas é epífita. No entanto, existem espécies rupícolas, terrícolas, palustres e mico-heterotróficas (Dressler 1993). As flores das orquídeas são geralmente zigomorfas e constituídas de três sépalas e três pétalas, sendo que uma delas é diferenciada em uma estrutura denominada labelo. Os órgãos reprodutivos das orquídeas se encontram fundidos em uma estrutura, a coluna, com uma ou, mais raramente, duas ou três anteras e uma região estigmática, formada pela fusão dos três lobos do estigma (Dressler 1981). As flores apresentam uma construção floral mais ou menos uniforme quanto ao número e arranjo de suas partes, mas há grande variação na estrutura, forma e tamanho da conformação básica, o que leva ao surgimento de estruturas muito complexas em algumas espécies (Mondragón-Palomino & Theißen 2009). A maioria das Orchidaceae apresenta os grãos de pólen reunidos em duas ou mais polínias, que, em conjunto com o viscidio, uma estrutura adesiva responsável pela fixação ao polinizador, mais o estipe, presente em alguns gêneros, formam o polinário (Dressler 1993).

Nas orquídeas, a diversidade de estruturas florais, está diretamente relacionada com os mecanismos de polinização (Fay & Chase 2009). As flores de Orchidaceae podem ser polinizadas por várias ordens de insetos – sendo Hymenoptera a mais comum (van der Pijl & Dodson 1966) – e ainda por beija-flores (van der Pijl & Dodson 1969) e roedores (Wang *et al.* 2008). Os mecanismos de polinização em Orchidaceae são intimamente relacionados aos seus polinizadores, o que demonstra tamanha a importância destes na evolução da família (Garay 1960, van der Pijl & Dodson 1966). Alguns autores ainda afirmam que as relações entre orquídeas e seus polinizadores podem ser tão profundas que resultam em grande especialização e diversidade da morfologia floral (Dressler 1981).

Em algumas orquídeas também pode ocorrer autopolinização espontânea, sem o auxílio de vetores bióticos (Catling 1980, Pansarin *et al.* 2008, Aguiar *et al.* 2012). Além disso, em cerca de um terço das espécies de Orchidaceae ocorre polinização por engano (Ackerman 1986), quando os polinizadores não são capazes de distinguir entre flores com e sem recursos (Renner 2006, Pansarin *et al.* 2008). Na maioria dos casos, ocorre engano generalizado de alimento, em que os polinizadores buscam por néctar em flores sem recursos (Jersáková *et al.* 2006). Muitas Orchidaceae que não produzem néctar apresentam estruturas que se assemelham a nectários florais (*e.g.*, cunículo de muitas Laeliinae) (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1993) e isso pode estar relacionado ao engano generalizado de alimento (Jersáková *et al.* 2006). Por não apresentarem recurso algum, as visitas às orquídeas polinizadas por engano são raras e, como consequência, essas plantas formam poucos frutos em relação às orquídeas que oferecem algum tipo de recompensa (Neiland & Wilcock 1998, Tremblay *et al.* 2005).

Por outro lado, as orquídeas que oferecem recompensas florais aos seus visitantes apresentam ampla variedade de recursos, sendo o néctar o mais comum (van der Pijl & Dodson 1969, Dressler 1993). Pólen, pseudopólen, óleos florais e fragrâncias são outros recursos que podem estar presentes nas flores de Orchidaceae (van der Pijl & Dodson 1966). Tal variedade nos recursos de polinização disponíveis é um reflexo da grande diversidade de glândulas florais presentes na família, de forma que as flores de suas espécies podem apresentar nectários (Aguiar *et al.* 2012, Pansarin *et al.* 2012, Nunes *et al.* 2013), elaióforos (Pansarin & Pansarin 2011, Blanco *et al.* 2013), osmóforos (Pansarin & Amaral 2009, Pansarin *et al.* 2013) e outras estruturas produtoras de recurso (van der Pijl & Dodson 1966).

Oncidiinae é uma das maiores subtribos de Orchidaceae, apresentando cerca de 1700 espécies (Chase *et al.* 2005). O grupo é altamente diverso em relação aos seus polinizadores e recursos florais, de forma que são encontradas desde espécies ornitófilas que produzem néctar, como *Comparettia falcata* Poeppig & Endlicher (van der Pijl & Dodson 1966, Ackerman 1995), até espécies como *Notylia nemorosa* Barb. Rodr., polinizada por machos de Euglossini e que oferece como recompensa fragrâncias florais (Singer & Koehler 2003). A maioria das espécies, no entanto, não apresentam recursos florais e são polinizadas por engano (Chase *et al.* 2005, L.M. Pansarin com. pess.).

O gênero *Ionopsis* Kunth pertence à Oncidiinae (Pridgeon *et al.* 2009) e possui seis espécies epífitas distribuídas ao longo da América e também nas ilhas de Galápagos (Alrich & Higgins 2008). Apesar da Lista de Espécies da Flora do Brasil considerar que existem três espécies do gênero no Brasil (Barros *et al.* 2014), atualmente *Ionopsis burchellii* Rchb.f é considerado um sinônimo de *I. satyrioides* (Sw.) Rchb.f. (Burchell. 9708 (Kew); Det. E.A. Christenson). Desta forma, para o Brasil devem ser consideradas apenas *I. satyrioides* e *I. utricularioides* (Sw.) Lindl.

Ionopsis satyrioides está presente no Caribe, América Central e norte da América do Sul e apresenta flores fragrantas (Ackerman 1995). *Ionopsis utricularioides*, por sua vez, é uma orquídea que apresenta grande distribuição, podendo ser encontrada na Flórida, México, América Central, Caribe, América do Sul e Ilhas de Galápagos (Ackerman 1995). Suas flores não apresentam recursos, e a polinização acontece por engano (Montalvo & Ackerman 1987). Os polinizadores de *I. satyrioides* e *I. utricularioides* não são conhecidos, mas ambas as espécies necessitam de polinizadores para formar frutos (Ackerman 1995). Além disso, sabe-se que uma espécie não identificada de *Ionopsis* é polinizada por abelhas *Trigona fulviventris* no Panamá (Roubik 2000).

Assim como ocorre com outras orquídeas polinizadas por engano, *Ionopsis utricularioides* não forma muitos frutos em condições naturais. Em um estudo realizado em Porto Rico foi demonstrado que as flores de *I. utricularioides* são autocompatíveis e que, mesmo com o incremento de polinizações manuais, as plantas apresentam baixa taxa de frutificação (6-19%). Isso indica que há uma limitação de recursos para a planta, abortando frutos excedentes. Em *I. utricularioides* o fato das flores não produzirem néctar também pode estar relacionada com a economia de energia pelas plantas (Montalvo & Ackerman 1987).

Espécies de plantas de ampla distribuição podem apresentar diferenças nos seus aspectos reprodutivos quando comparados os diferentes locais em que ocorrem. Variações no sistema reprodutivo são evidentes principalmente quando se compara espécies que ocorrem em ambientes continentais e insulares (Baker 1967). Em *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl., por exemplo, foram encontradas diferenças na biologia reprodutiva quando comparadas populações brasileiras (continentais) e de Porto Rico (insulares) (Aguiar *et al.* 2012). Campbell (1987) aponta os problemas causados por generalizações realizadas em estudos de polinização feitos em uma única área. Estudos realizados em mais de uma área de ocorrência são importantes,

principalmente em espécies com ampla distribuição. Muitas vezes, quando estudos de biologia floral de uma espécie são realizados em mais de uma localidade, diferenças são observadas em relação à sua biologia reprodutiva (Smith & Snow 1976, Cole & Firmage 1984).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar e descrever em detalhes aspectos da biologia floral e reprodutiva das espécies de *Ionopsis* brasileiras. O primeiro capítulo descreve as glândulas florais existentes nas duas espécies apresentadas, bem como os compostos por elas produzidos, trazendo uma discussão a respeito da importância do estudo anatômico e histoquímico das flores de orquídeas, além da caracterização química das substâncias produzidas por elas. O segundo capítulo trata detalhadamente da biologia reprodutiva e da polinização de *I. utricularioides* no Brasil, comparando o que já foi descrito para populações em Porto Rico e revelando a identidade dos polinizadores dessa espécie.

Capítulo 1

Osmóforos e compostos voláteis florais das *Ionopsis* Kunth (Orchidaceae) brasileiras

***Orquídeas não foram feitas por um engenheiro ideal;
elas são um improviso a partir de um conjunto de componentes limitados
disponíveis. Assim, elas tem que ter evoluído a partir de flores comuns.***

Stephen Jay Gould

Resumo

Osmóforos são as estruturas florais responsáveis por produzirem compostos voláteis que compõem a fragrância. Em orquídeas, essas substâncias fragrantas podem estar relacionadas à atração dos polinizadores ou ainda serem utilizadas como recurso de polinização. A estrutura anatômica dos osmóforos e a identidade dos compostos químicos presentes nas espécies brasileiras de *Ionopsis* foram estudados utilizando testes histoquímicos e análises por GC-MS, respectivamente. Foi encontrado que *I. satyrioides* possui osmóforos nas protuberâncias entre os lobos laterais do labelo, caracterizados por uma epiderme lisa que produz uma fragrância predominantemente composta por farnesol. Além dos osmóforos nas protuberâncias, *I. utricularioides* ainda possui papilas secretoras ao redor das protuberâncias, produzindo uma fragrância composta principalmente por ocimeno ou pentadecan-2-ona. Ambas as espécies puderam ser distinguidas por meio de seus voláteis florais. Estudos sobre a anatomia das glândulas florais e das fragrâncias produzidas por elas são muito importantes, uma vez que ajudam a entender tanto a polinização quanto a evolução da numerosa e diversa família das orquídeas.

Palavras-chave: farnesol – fragrância floral – GC-MS – testes histoquímicos – ocimeno – Oncidiinae – pentadecan-2-ona – compostos voláteis

Abstract

Osmophores are the floral structures responsible for producing volatile compounds. In orchids, these fragrant substances can be related to attraction of pollinators or even be used as a pollination resource. The anatomic structure of the osmophores and the identity of the chemical compounds present in Brazilian species of *Ionopsis* were studied using histochemical tests and GC-MS analysis, respectively. It was found that *I. satyrioides* possess an osmophore on the protuberances at the base of the lip, characterized as a flat epidermis that produces a fragrance mainly composed by farnesol. On the other hand, *I. utricularioides*, additionally possess a papillose osmophore, on the protuberances region at the base of the labellum, which produces a fragrance with ocimene or pentadecan-2-one as the major constituent. Both species could be distinguished through the floral bouquet components. Studies on the anatomy of floral glands and on the floral fragrances are very important once they help understanding the pollination and evolution of the huge and diverse orchid family.

Keywords: farnesol - floral scent – GC-MS - histochemical tests - ocimene - Oncidiinae - pentadecan-2-one - volatile compounds

Introdução

A família Orchidaceae é conhecida pela sua grande diversidade de estruturas florais, incluindo as glândulas florais (van der Pijl & Dodson 1966, Mondragón-Palomino & TeiBen 2008). As flores das orquídeas podem possuir nectários (Aguiar *et al.* 2012, Pansarin *et al.* 2012, Nunes *et al.* 2013), elaióforos (Pansarin & Pansarin 2010, Blanco *et al.* 2013), osmóforos (Pansarin *et al.* 2009, Pansarin *et al.* 2013) e outras estruturas produtoras de recursos (van der Pijl & Dodson 1966). Essas glândulas florais geralmente estão diretamente relacionadas aos processos de polinização, uma vez que elas produzem recursos florais e/ou compostos voláteis relacionados à atração de polinizadores (e.g., van der Pijl & Dodson 1966). Esses compostos voláteis também podem ser considerados como recurso de polinização nos casos em que a fragrância é coletada por abelhas Euglossini (Pansarin & Amaral 2009).

Osmóforos são as estruturas responsáveis por produzir as fragrâncias florais (Vogel 1963, 1990). Eles podem ser encontrados como uma única camada de células epidérmicas ou, ainda, podem ser compostos por papilas uni ou multicelulares (Curry *et al.* 1991, Endress 1994, Ascensão *et al.* 2005, Cseke *et al.* 2007, Pansarin *et al.* 2009). Nas orquídeas, os osmóforos produzem fragrâncias que podem ser muito diversas em sua composição química e a maioria das espécies apresentam uma fragrância constituída por cerca de sete a dez diferentes compostos (Dodson *et al.* 1969).

Ionopsis Kunth (Oncidiinae) é um gênero de orquídeas que possui seis espécies epífitas, distribuídas ao longo das Américas e também nas Ilhas de Galápagos (Alrich & Higgins 2008). Apesar de Barros *et al.* (2013) considerar três espécies de *Ionopsis* ocorrendo no Brasil, *I. burchellii* Rchb.f. é atualmente considerada um sinônimo de *I. satyrioides* (Sw.) Rchb.f. (Burchell. 9708 (Kew); Det. E.A. Christenson). Assim, apenas *I. satyrioides* e *I. utricularioides* (Sw.) Lindl. devem ser consideradas como espécies do gênero que ocorrem no Brasil.

Ambas as espécies necessitam de polinizadores para produzirem frutos (Ackerman 1995, Aguiar *et al.* in prep.). As flores de *Ionopsis satyrioides* são fragrantas (Ackerman 1995), mas não existem dados a respeito dos osmóforos responsáveis por produzir seus compostos voláteis e qual a identidade química destes. *Ionopsis utricularioides* é considerada uma espécie polinizada por engano (Ackerman

1995) e também não existem informações sobre a presença de osmóforos ou compostos fragrantos nessa espécie. Desta forma, esse estudo teve por objetivo investigar a anatomia e a histoquímica das glândulas florais e a composição química das fragrâncias presentes nas flores das *Ionopsis* brasileiras.

Materiais e Métodos

Locais de estudo

Os dados foram coletados a partir de plantas mantidas em cultivo no Orquidário LBMBP (Orquidário do Laboratório de Biologia Molecular e Biossistemática de Plantas), da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil (Col. *J.M.R.B.V. Aguiar LBMBP 450, LBMBP 455, LBMBP 456, LBMBP 747, LBMBP 748*). As plantas de *Ionopsis satyrioides* foram obtidas de duas populações: Apuí (07° 11' S, 59° 53' O), Amazonas, e Rondolândia (10° 10' S, 59° 28' O), Mato Grosso, Brasil. Essa região é composta pela floresta tropical amazônica e seu clima pode ser caracterizado como “Ami” (Köppen 1948), com uma curta estação seca, apresentando alta quantidade de chuvas nos outros períodos do ano (Moraes *et al.* 1996). As plantas de *I. utricularioides* coletadas são provenientes de três populações do interior do estado de São Paulo, Brasil: São Simão (21° 28' S, 47° 33' O), Pradópolis (21° 21' S, 48° 03' O) e Dobrada (21° 31' S, 48° 23' O). Essa região apresenta um clima caracterizado como “Cwa” (mesotérmico com uma estação seca de inverno) de acordo com Köppen (1948), e é predominantemente composta por florestas mesofíticas semidecíduas (Pinto 1989).

Estudos anatômicos e histoquímicos

Cinco flores frescas de cada espécie foram coletadas no primeiro dia de antese e usadas nos testes histoquímicos. Duas flores de cada espécie foram mergulhadas em vermelho neutro aquoso 0,1% (m/v) por 20 minutos (Vogel 1963) para detectar regiões metabolicamente ativas. Posteriormente, as flores foram lavadas em água e examinadas. Cortes à mão das regiões metabolicamente ativas do labelo de flores frescas foram testados com Sudan IV (Sass 1951) para lipídeos, cloreto de ácido

tânico (Pizzolato 1977) para mucilagem, reagente de Fehling para açúcares redutores (Purvis *et al.* 1964), Lugol para amido (Johansen 1940) e cloreto férrico 10% (Johansen 1940) para compostos fenólicos. Para todos os testes histoquímicos, foram realizados controles, simultaneamente.

Para caracterizar a estrutura anatômica dos osmóforos, foi seguida a mesma metodologia adotada por Pansarin *et al.* (2006). Flores recém abertas foram fixadas em Formalina-Glutaraldeído-Ácido-Álcool (FGAA) e armazenadas em etanol 70%. Os labelos foram, então, desidratados em série etanólica e incluídos em historesina. Cortes transversais de 8 µm de espessura foram realizados utilizando micrótomo rotativo e corados com azul de toluidina (Sakai 1973). Imagens digitais de todos os cortes histológicos foram obtidas usando um microscópio óptico Leica DM500 com uma câmera digital Leica ICC50 acoplada e analisadas com o software IM50.

Análise química dos compostos voláteis

Para o headspace com microextração em fase sólida (HS-SPME) dos voláteis florais, as flores foram colocadas separadamente em um frasco de vidro de 20 ml e submetidas à temperatura constante de 35 °C por 60 minutos. Durante esse período, a fibra de sílica fundida coberta com 100 µm de polidimetilsiloxano (PDMS) (Supelco Inc., Bellefont, PA) foi inserida no frasco e exposta ao headspace floral.

A análise dos compostos voláteis foi realizada usando um cromatógrafo a gás acoplado à um espectrômetro de massa QP2010 Shimadzu. Um detector de espectrometria com fonte de ionização por elétrons (EI-MS) foi operado sob a temperatura da fonte a 250 °C, uma corrente de emissão de 60 µA e uma energia de ionização de 70 eV. O tempo global de corrida foi registrado em modo de varredura completo (40-500 m/z de variação de massa) e uma proporção de leitura de 0,30 scan s⁻¹. Os compostos foram dessorvidos termicamente da fibra SPME no injetor por 2 minutos a 250 °C, com modo de injeção em *splitless*. Esses compostos foram separados em uma coluna capilar DB-5MS (J&W Agilent) de 30 m X 0,24 mm, sendo a espessura do filme de 0,25 µm, com He (79,7 kPa) como gás de arraste a um fluxo de 1,3 ml min⁻¹. A temperatura do GC se iniciou a 60 °C, e aumentou linearmente 3 °C por minuto até atingir 240 °C, durante 60 minutos.

Os dados de cromatografia foram analisados com o software GC-MS Solution e os compostos voláteis foram identificados com as bibliotecas NIST 62, WILEY 7 e

FFNSC 1.3, por comparação dos espectros de MS. Além disso, os índices de retenção de Kováts (KI) de cada composto foram calculados de acordo com a fórmula de Kováts (Robards *et al.* 1994). As áreas de cada pico dos cromatogramas foram integradas para determinar a abundância relativa de cada composto.

Resultados

Estudos anatômicos e histoquímicos

As flores de *Ionopsis satyrioides* são predominantemente brancas com guias de néctar roxos nas pétalas e labelo (Fig. 1A-B). Elas possuem duas protuberâncias triangulares, longitudinais e amarelas entre os lobos laterais do labelo, que também atuam como guia de néctar (Fig. 1B-C). O teste com vermelho neutro indicou que essa é a região produtora de odor nesta espécie (Fig. 1D). Os cortes transversais das protuberâncias revelaram uma epiderme com uma camada de células arredondadas e com um parênquima adjacente formado por células anisodiamétricas (Fig. 1E). Essas células epidérmicas arredondadas são responsáveis pela produção da fragrância, uma vez que possuem núcleo grande e citoplasma denso quando coradas com azul de toluidina, indicando atividade metabólica intensa. Apenas o teste com Sudan IV obteve resultado positivo, revelando a natureza lipofílica da substância secretada pelas células (Fig. 1F). Os demais testes histoquímicos apresentaram resultados negativos. Essa espécie possui uma fragrância suave que pode ser facilmente percebida pelo olfato humano.

A maioria das flores de *Ionopsis utricularioides* estudadas apresentavam coloração rosa ou lilás, com guias de néctar roxos no labelo (Fig. 2A-B). No entanto, plantas com flores brancas também foram encontradas nas populações analisadas. Foram encontradas duas protuberâncias arredondadas, longitudinais e amarelas entre os lobos laterais do labelo, que também atuam como guias de néctar (Fig. 2B-C). Tanto as protuberâncias quanto as papilas presentes ao redor das mesmas foram coradas no teste com vermelho neutro, indicando que nesta região é produzido o odor (Fig. 2D). Os cortes transversais da região revelaram uma epiderme papilosa com um parênquima adjacente formado por células anisodiamétricas. Tanto as papilas digitiformes quanto as células arredondadas da epiderme das protuberâncias possuem núcleo grande e citoplasma densamente corado por azul de toluidina, indicando

intensa atividade metabólica (Fig. 2E). Todos os testes histoquímicos foram negativos, incluindo o teste com Sudan IV (Fig. 2F). A fragrância nessa espécie é praticamente imperceptível para o olfato humano.

Análise química dos compostos voláteis

Foram encontrados sete compostos voláteis diferentes nas flores de *Ionopsis satyrioides* e 22 nas flores de *I. utricularioides*. O volátil floral mais abundante em ambas as populações analisadas de *I. satyrioides* foi o Z,Z-farnesol com uma porcentagem de área relativa de 54,2%. Foi encontrada variação na fragrância quando comparadas as populações de *I. utricularioides* estudadas. O composto mais abundante para as populações de São Simão e Dobrada foi o β -ocimeno (70,2% e 32,3%, respectivamente), enquanto que para a população de Pradópolis o composto mais abundante foi a pentadecan-2-ona (35,1%). A Tabela 1 mostra os dados obtidos para os compostos voláteis detectados nas populações de *I. satyrioides* e *I. utricularioides*.

Discussão

Em Orchidaceae os osmóforos podem estar localizados em diferentes regiões da flor, mas são mais comumente encontrados na superfície adaxial do labelo (Stern *et al.* 1986, Vogel 1990, Antón *et al.* 2012), onde também foram encontrados os osmóforos de ambas as espécies de *Ionopsis* estudadas no presente trabalho. Um osmóforo com epiderme sem papilas, como registrado para *I. satyrioides*, também ocorre em outras espécies de orquídeas, como *Cirrhaea dependens* Loudon (Pansarin *et al.* 2006), *Epidendrum martianum* Lindl. (B.C. Vieira, com. pess.) e *Vanilla edwallii* Hoehne (Pansarin *et al.* 2013). Ainda, osmóforos papilosos, como o que foi revelado para *I. utricularioides*, também podem ser encontrados nas flores de Orchidaceae (Davies & Turner 2004, Pansarin *et al.* 2009).

Em *Ionopsis satyrioides* a análise histoquímica revelou a natureza lipofílica da substância produzida, uma vez que o teste com Sudan IV se mostrou positivo. A produção de óleos voláteis já foi amplamente descrita para espécies pertencentes à Orchidaceae (Pansarin *et al.* 2009, Fancisco & Ascensão 2013), incluindo espécies de Oncidiinae (Stpiczyńska & Davies 2013, Pansarin *et al.* in prep.) Os resultados

negativos para o teste com Lugol em ambas as espécies pode ser um indicador de ausência de amido ou que tal reserva já tinha sido consumida pela flor para a produção da fragrância. Stpiczyńska (2001) sugere que o amido está envolvido na síntese de substâncias voláteis na orquídea *Gymnadenia conopsea* L. O teste de Sudan IV também foi negativo nas flores de *I. utricularioides*, provavelmente porque as flores já tinham liberado seu aroma, identificado pela análise por GC-MS.

A fragrância tem um papel importante na atração dos polinizadores às flores de orquídeas (van der Pijl & Dodson 1966). Os voláteis florais são especialmente importantes na polinização de orquídeas Stanhopeiinae, atuando tanto na atração quanto como recurso de polinização para machos de abelhas Euglossini (Stern *et al.* 1986, Pansarin *et al.* 2006). A fragrância é igualmente importante em orquídeas polinizadas por engano, atuando como um falso sinal para machos jovens de vespas e abelhas em mecanismos de engano sexual (Singer 2002, Stökl *et al.* 2007), moscas saprofíticas em orquídeas que apresentam engano de local de oviposição (Humeau *et al.* 2011), e muitos outros polinizadores em orquídeas com engano de alimento (Moya & Ackerman 1993, Salzmann *et al.* 2007). Este último caso parece ser o que ocorre com as espécies brasileiras de *Ionopsis*, uma vez que *I. utricularioides* não possui néctar (Ackerman 1995), assim como *I. satyrioides* (L.M. Pansarin, com. pess.). No entanto, apenas estudos focados no mecanismo de polinização dessas espécies podem assegurar que os polinizadores não utilizam os voláteis florais como recurso de polinização.

Os principais compostos das fragrâncias presentes em ambas as espécies de *Ionopsis* estudadas podem ser encontrados em aromas florais de outras orquídeas. O farnesol, composto principal da fragrância de *I. satyrioides*, também é parte importante das fragrâncias das orquídeas africanas *Mystacidium venosum* Kraenzl, polinizada por mariposas Esfingiidae (Luyt & Johnson 2001) e *Eulophia parviflora* (Lindl.) A.V.Hall, polinizada por abelhas (Peter 2008). Em *I. utricularioides* os componentes principais foram ocimeno nas populações de Dobrada e São Simão e pentadecan-2-ona na população de Pradópolis. O ocimeno pode ser igualmente encontrado como um dos componentes da fragrância floral de espécies de *Orchis* Tourn. ex L. (Salzmann *et al.* 2007), *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pav. (Reis *et al.* 2004) e em pequenas quantidades em *Polystachia estrellensis* Hook. (Reis *et al.* 2004), *Mormodes lineata* Bateman ex Lindl. e *Gongora galeata* (Lindl.) Rchb.f. (Cancino & Damon 2007). Flores de outros grupos de plantas, como a alfafa

(*Medicago sativa* L.) e o trevo vermelho (*Trifolium repens* L.) também apresentam ocimeno em suas fragrâncias florais (Waller *et al.* 1974, Buttery *et al.* 1984). Todas essas espécies que apresentam ocimeno são polinizadas por abelhas. A pentadecan-2-ona também foi encontrada como constituinte do cheiro da orquídea *Disa spathulata* (L.f.) Sw., também polinizada por abelhas (Johnson *et al.* 2005), e em várias orquídeas secretoras de óleo da África do Sul (Steiner *et al.* 2011). No entanto, o presente estudo não pode estabelecer a importância desses compostos voláteis na polinização das *Ionopsis* do Brasil, uma vez que seus polinizadores ainda são desconhecidos (Ackerman 1995). Estudos sobre a polinização das *Ionopsis* brasileiras estão sendo preparados, de forma a elucidar essa questão (Aguiar *et al.* in prep.). A composição da fragrância floral pode ser considerada uma maneira efetiva de distinguir as espécies brasileiras de *Ionopsis*, uma vez que os componentes do aroma das populações analisadas de *I. satyrioides* não foram encontrados em nenhuma das populações estudadas de *I. utricularioides*, e o contrário é igualmente verdadeiro.

Foi encontrada variação na fragrância floral de plantas de *Ionopsis utricularioides* originárias de diferentes populações. Isso também foi encontrado para outras orquídeas polinizadas por engano. Nas orquídeas do gênero *Orchis*, polinizadas por engano de alimento, Salzmann *et al.* (2007) revelou variação intra- e interpopulacional nos voláteis que compõem as fragrâncias. Do mesmo modo, diferenças populacionais foram encontradas na fragrância floral de orquídeas polinizadas por engano sexual pertencentes ao gênero *Ophrys* L., e isso pode ter sido conduzido por preferências de polinizadores em cada população (Mant *et al.* 2005). Variação entre flores de diferentes populações também foi localizada na orquídea *Epidendrum ciliare* L., que é polinizada por mariposas, como uma estratégia que atrapalha o processo de aprendizagem associativa dos polinizadores, inibindo suas habilidades em reconhecer flores sem recursos (Moya & Ackerman 1993). No entanto, esta hipótese foi pouco testada e estudos recentes tem mostrado que a variação nos atributos florais de orquídeas polinizadas por engano pode não possuir ligação com seu sucesso reprodutivo (Juillet & Scopece 2010). Além disso, a variação interpopulacional na fragrância de orquídeas com recurso também ocorre, como no caso de *Disa fragrans* Schltr. que possui néctar em suas flores, e isso parece estar relacionado a uma mudança evolutiva para a polinização generalizada (Johnson & Hobbhahn 2010). Ainda, diferentes fatores ambientais como temperatura, umidade e

solo, podem ser responsáveis pela variação intraespecífica no aroma floral (Dobson *et al.* 1997, Nault 2003, Salzmann *et al.* 2007).

Estudos sobre a anatomia dos osmóforos em orquídeas tem sido intensificados nos últimos anos (e.g., Wiener *et al.* 2009, Antón *et al.* 2012, Francisco & Ascensão 2013). No entanto, a identidade dos compostos químicos das fragrâncias produzidas é geralmente negligenciada, especialmente para orquídeas polinizadas por engano de alimento, em que a cor é considerada o principal atributo atrativo (Dafni 1986) e a maioria das flores produzem fragrâncias fracas para o olfato humano. Foi revelado com este estudo que osmóforos relativamente simples podem produzir complexas fragrâncias florais nas espécies brasileiras de *Ionopsis*, particularmente em *I. utricularioides* que apresenta um aroma praticamente imperceptível para humanos, mas que é composto por 22 diferentes componentes químicos. Ainda, a fragrância floral se mostrou um caráter taxonômico confiável para essas espécies, uma vez que com as diferenças encontradas nos componentes do aroma floral é possível distingui-las. Assim, mais estudos devem levar em consideração não apenas o aspecto estrutural da produção de odor, mas também quais são os voláteis responsáveis pela fragrância floral. Além disso, identificar os compostos químicos das fragrâncias é importante para compreender a polinização, biodiversidade e evolução de Orchidaceae.

Agradecimentos específicos

Os autores agradecem Nielson A.P. Salvados (Universidade de São Paulo) e Alvino J. da Silva pela ajuda na coleta das plantas, e Izabel C.C. Turatti (Universidade de São Paulo) pela ajuda com a análise GC-MS. Os autores ainda agradecem Leonardo G. Neto, Ludmila M. Pansarin, e Maria E.P. Martucci pelo auxílio na produção do artigo científico escrito com os resultados desse capítulo. Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos 2011/12720-2 e 2012/16646-4).

Referências Bibliográficas

- Ackerman J.D. 1995. *An orchid flora of Puerto Rico and the Virgin Islands*. NYBG, New York
- Aguiar J.M.R.B.V., Pansarin L.M., Ackerman J.D. & Pansarin E.R. 2012. Biotic vs. abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Plant Species Biology* 27: 86-95.
- Alrich P., Higgins W. 2008. *The Marie Selby Botanical Gardens Illustrated Dictionary of Orchid Genera*. Cornell University Press, London
- Antón S., Kamińska M., Stpiczyńska M. 2012. Comparative structure of the osmophores in the flowers of *Stanhopea graveolens* Lindley and *Cycnoches chlorochilon* Klotzsch (Orchidaceae). *Acta Agrobotanica* 65: 11-22.
- Ascensão L., Francisco A., Cotrim H., Pais M.S. 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92: 1059–1067.
- Barros F. de, Vinhos F., Rodrigues V.T., Barberena F.F.V.A., Fraga C.N. & Pessoa E.M.. 2013. Orchidaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000179>).
- Blanco M.A., Davies K.L., Stpiczyńska M., Carlsward B.S., Ionta G.M., Gerlach G. 2013. Floral elaiophores in *Lockhartia* Hook. (Orchidaceae: Oncidiinae): their distribution, diversity and anatomy. *Annals of Botany* 112: 1775-1791.
- Buttery R.G., Kamm J.A., Ling L.C. 1984. Volatile components of red clover leaves, flowers, and seed pods: possible insect attractants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 254–256.
- Cancino A.D., Damon A. 2007. Fragrance analysis of euglossine bee pollinated orchids from Soconusco, south-east Mexico. *Plant Species Biology* 22: 129–134.
- Cseke L.J., Kaufman P.B., Kirakosyan A. 2007. The biology of essential oils in the pollination of flowers. *Natural Product Communications* 2: 1317–1336.
- Curry K.J., McDowell L.M., Judd W.S., Stern W.L. 1991. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 78: 610–623.
- Dafni A. 1986. Floral mimicry – mutualism and undirectional exploitation of insects by plants. In: Juniper B, Sothwood R, eds. *Insects and the Plant Surface*.

- Edward Arnold, London. pp: 81–90.
- Davies K.L., Turner M.P. 2004. Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93: 75–86.
- Dobson H.E.M., Arroyo J., Bergström G., Groth I. 1997 Interspecific variation in floral fragrances within the genus *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 685-706.
- Dodson C.H., Dressler R.H., Hills H.G., Adams R.M., Williams N.H. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Endress P.K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Francisco A., Ascensão L. 2013. Structure of the osmophore and labellum micromorphology in the sexually deceptive orchids *Ophrys bombyliflora* and *Ophrys tenthredinifera* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences* 174: 619-636.
- Humeau L., Micheneau C., Jacquemyn H., Gauvin-Bialecki A., Fournel J., Paillet T. 2011. Sapromyiophily in the native orchid, *Bulbophyllum variegatum*, on Runión (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Journal of Tropical Ecology* 27: 591-599.
- Johansen D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co, New York.
- Johnson S.D., Hobbhan N. 2010. Generalized pollination, floral scent chemistry, and a possible case of hybridization in the African orchid *Disa fragrans*. *South African Journal of Botany* 76: 739-748.
- Johnson S.D., Steiner K.E., Kaiser R. 2005. Deceptive pollination in two subspecies of *Disa spathulata* (Orchidaceae) differing in morphology and floral fragrance. *Plant Systematics and Evolution* 255: 87-98.
- Juillet N., Scopece G. 2010. Does floral trait variability enhance reproductive success in deceptive orchids? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12: 317-322.
- Köppen W. 1948. *Climatologia*. Ed. Fondo de Cultura e Economía, México.
- Luyt R., Johnson S.D. 2001. Hawkmoth pollination of the African epiphytic orchid *Mystacidium venosum*, with special reference to flower and pollen longevity. *Plant Systematics and Evolution* 228: 49-62.
- Mant J., Peakall R., Schiestl F.P. 2005. Does selection on floral odor promote differentiation among populations and species of the sexually deceptive orchid

- genus *Ophrys*? *Evolution* 59: 1449-1463.
- Mondragón-Palomino M., Theißen G. 2009. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. *Annals of Botany* 104: 583–594.
- Moraes J.F.L., Volkoff B., Cerri C.C., Bernoux M. 1996. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondônia, Brazil. *Geoderma* 70: 63-81.
- Moya S., Ackerman J.D. 1993. Variation in the floral fragrance of *Epidendrum ciliare* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* 13: 41-47.
- Nault, J.R. 2003. Site temperatures influence seasonal changes in terpene composition in Douglas-fir vegetative buds and current year foliage. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne De Recherche Forestière* 33: 2269–2273.
- Nunes C.E.P., Castro M.D., Galetto L., Sazima M. 2013. Anatomy of the floral nectary of ornithophilous *Elleanthus brasiliensis* (Orchidaceae: Sobralieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 764-772.
- Pansarin E.R., Aguiar J.M.R.B.V., Pansarin L.M. 2013. Floral biology and histochemical analysis of *Vanilla edwallii* Hoehne (Orchidaceae: Vanilloideae): an orchid pollinated by *Epicharis* (Apidae: Centridini). *Plant Species Biology* no prelo.
- Pansarin E.R., Amaral M.C.E. 2009. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea* Frost ex. Hook. *Flora* 204: 238-249.
- Pansarin E.R., Bittrich V., Amaral M.C.E. 2006. At daybreak – reproductive biology and isolation mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). *Plant Biology* 8: 494-502.
- Pansarin E.R., Pansarin L.M. 2011. Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-collecting bees. *Plant Biology* 13: 576-581.
- Pansarin E.R., Salatino A., Pansarin L.M., Sazima M. 2012. Pollination systems in Pogonieae (Orchidaceae: Vanilloideae): A hypothesis of evolution among reward and rewardless flowers. *Flora* 12: 849-861.
- Pansarin L.M., Castro M.D., Sazima M. 2009. Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 408-415.
- Peter C.I. 2008. *Pollination, floral deception and evolutionary processes in Eulophia (Orchidaceae) and its allies*. Tese de Doutorado. University of KwaZulu-Natal,

South Africa.

- Pinto M.M. 1989. *Levantamento fitossociológico de uma mata residual: Campus de Jaboticabal da UNESP*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Pizzolato T.D. 1977. Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid–ferric chloride. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104: 277–279.
- Purvis M.J., Collier D.C., Walls D. 1964. *Laboratory Techniques in Botany*. Butterworths, London.
- Reis M.G., Pansarin E.R., Silva U.F., Amaral M.C.E., Marsaioli A.J. 2004. Pollinator attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids. *Arkivoc* 4: 103–111.
- Robards K., Haddad P.R., Jackson P.E. 1994. *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press, New York
- Sakai W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* 43: 247–249.
- Salzmann C.C., Cozzolino S., Schiestl F.P. 2007. Floral scent in food-deceptive orchids: species specificity and sources of variability. *Plant Biology* 9: 720–729.
- Sass J.E. 1951. *Botanical Microtechnique*. The Iowa State College Press, Ames
- Singer R.B. 2002. The pollination mechanism in *Trigonidium obtusum* Lindl. (Orchidaceae: Maxillariinae): sexual mimicry and trap-flowers. *Annals of Botany* 89: 157–163.
- Steiner K.E., Kaiser R., Dötterl S. 2011. Strong phylogenetic effects on floral scent variation of oil-secreting orchids in South Africa. *American Journal of Botany* 98: 1663–1679.
- Stern W.L., Curry K.J., Whitten W.M. 1986. Staining fragrance glands in orchid flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 113: 288–297.
- Stökl J., Twele R., Erdmann D.H., Francke W., Ayasse M. 2007. Comparison of the flower scent of the sexually deceptive orchid *Ophrys iricolor* and the female sex pheromone of its pollinator. *Andrena morio*. *Chemoecology* 17: 231–233.
- Stpiczynska M. 2001. Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70: 91–96.
- Stpiczynska M., Davies K.L. 2013. Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *Oncidium trulliferum* Lindl. and *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst (Oncidiinae: Orchidaceae). *Annals of Botany* 101: 375–384.

- van der Pijl L., Dodson C.H. 1966. *Orchid flowers, their pollination and evolution*. University of Miami Press, Florida
- Vogel S. 1963. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen- und Stanhopeen Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. *Osterreichische Botanische Zeitschrift* 100: 308–337.
- Vogel S. 1990. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. New Delhi: Amerind Publishing Co.
- Waller G.D., Loper G.M., Berdel R.L. 1974. Olfactory discrimination by honeybees of terpenes identified from volatiles of alfalfa flowers. *Journal of Apicultural Research* 13: 191–197.
- Wiemer A.P., Moré M., Benitez-Vieyra S., Cocucci A.A., Raguso R.A., Sérsic A.N. 2009. A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology* 11: 506-514.

Tabela 1: Compostos voláteis detectados nas fragrâncias florais de *Ionopsis satyrioides* e *I. utricularioides*. Os compostos mais abundantes de cada população estão indicados em negrito. Note que nenhum dos componentes é encontrado em ambas as espécies.

Tempo de retenção (min)	Compostos voláteis	Índice de Kováts	Abundância relativa (%)				
			<i>I. satyrioides</i>	<i>I. satyrioides</i>	<i>I. utricularioides</i>	<i>I. utricularioides</i>	<i>I. utricularioides</i>
			Apuí	Rondolândia	São Simão	Pradópolis	Dobrada
8.6	β-ocimene	1042	-	-	70.2	4.2	32.3
10.6	linalool	1108	-	-	-	1.3	9.4
23.1	α-gurjunene	1409	-	-	-	1.7	-
23.2	tetradecane	1310	-	-	-	-	6.4
23.3	β-caryophyllene	1414	-	-	6.5	-	-
23.6	dodecanal	1420	-	-	-	0.6	-
23.9	β-dihydroionone	1429	18.2	18.2	-	-	-
24.4	trans-α-bergamotene	1429	-	-	6.6	4.4	2.7
25.3	β-farnesene	1451	-	-	1.0	0.7	1.5
25.8	β-ionone	1475	19.6	19.6	-	-	-
26.6	benzyl (E)-2-methyl-	1495	-	-	4.6	-	-

Tempo de retenção (min)	Compostos voláteis	Índice de Kováts	Abundância relativa (%)				
			<i>I. satyrioides</i>	<i>I. satyrioides</i>	<i>I. utricularioides</i>	<i>I. utricularioides</i>	<i>I. utricularioides</i>
			Apuí	Rondolândia	São Simão	Pradópolis	Dobrada
	2-butenolate						
27.1	trans-2-butenic acid	1507	-	-	-	8.6	-
27.3	pentadecane	1511	-	-	-	-	9.8
27.4	α -farnesene	1514	-	-	-	-	2.7
27.5	β -bisabolene	1504	-	-	1.6	1.2	1.1
27.6	γ -bisabolene	1507	-	-	2.6	1.7	1.2
30.1	farnesyl cyanide	1571	-	-	1.9	5.7	-
33.1	caprylic ether	1662	1.7	1.7	-	-	-
34.8	pentadecan-2-one	1709	-	-	-	35.1	-
35.0	Z,Z-farnesol	1713	54.2	54.2	-	-	-
35.2	2-hexadecanol	1718	-	-	-	2.3	-
37.2	benzyl benzoate	1775	-	-	-	2.8	-
39.4	isopropyl tetradecanoate	1838	-	-	-	1.4	-

Tempo de retenção (min)	Compostos voláteis	Índice de Kováts	Abundância relativa (%)				
			<i>I. satyrioides</i>	<i>I. satyrioides</i>	<i>I. utricularioides</i>	<i>I. utricularioides</i>	<i>I. utricularioides</i>
			Apuí	Rondolândia	São Simão	Pradópolis	Dobrada
39.9	hexahydrofarnesyl acetone	1854	-	-	-	1.1	-
41.5	(Z)-9-hexadecanoic acid methyl ester	1901	1.8	1.7	-	-	-
45.2	nonadecane	2014	-	-	-	-	2.4
48.3	heneicosane	2100	-	-		3.2	9.8
47.7	(Z,Z,Z)-9,12,15- octadecatrienoic acid methyl ester	2094	2.6	2.6	-	-	-
47.9	(Z)-9-octadecanoic acid methyl ester	2102	2.0	2.0	-	-	-

Figura 1: Flores, anatomia dos osmóforos e testes histoquímicos de *Ionopsis satyrioides* (Sw.) Rchb.f. A: Inflorescência de *I. satyrioides*. B: Flor de *I. satyrioides*. Note as protuberâncias no labelo (seta). C: Detalhe do labelo mostrando o formato triangular das protuberâncias (setas). D: Resultado positivo para o teste com vermelho neutro, indicando que as protuberâncias são responsáveis pela produção da fragrância. E: Corte transversal do osmóforo de *I. satyrioides* corado com azul de toluidina. Note como a epiderme é formada por células arredondadas com núcleo grande e citoplasma denso. F: Resultado positivo para o teste Sudan IV, revelando a natureza lipofílica da substância que está sendo produzida pelas protuberâncias. Barras de escala: A: 10mm. B: 5mm. C, D: 2mm. E, F: 100µm.

Figura 2: Flores, anatomia dos osmóforos e testes histoquímicos de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. A: Inflorescência de *I. utricularioides*. B: Flor de *I. utricularioides*. Note a protuberância no labelo (seta). C: Detalhe do labelo mostrando o formato arredondado das protuberâncias. É possível visualizar muitas papilas na região. D: Resultado positivo para o teste com vermelho neutro, indicando que ambas as papilas adjacentes às protuberâncias (seta) e as protuberâncias (detalhe) são responsáveis pela produção da fragrância. E: Corte transversal da epiderme papilosa de *I. utricularioides* corado com azul de toluidina. Note como as células produtoras de odor apresentam um núcleo grande e citoplasma denso (setas). F: Resultado negativo para o teste Sudan IV. Provavelmente as células já haviam liberado os óleos voláteis. Barras de escala: A: 10mm. B: 5mm. C, D: 0,5mm. E, F: 100µm.

Figura 1

Figura 2

Capítulo 2

**Biologia reprodutiva de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl.
(Orchidaceae): uma orquídea de ampla distribuição
polinizada por engano de néctar**

Difícilmente podemos acreditar em tão gigantesca fraude.
Charles Darwin, sobre polinização por engano em orquídeas

Resumo

Ionopsis utricularioides (Sw.) Lindl. é uma orquídea epífita de ampla distribuição, ocorrendo da Florida até a América do Sul. Sabe-se que a espécie não possui recursos de polinização e a identidade de seus polinizadores ainda é desconhecida. Em Porto Rico, a espécie é autocompatível e a taxa de frutificação em condições naturais é baixa. Baseando-se em dados sobre a fenologia reprodutiva, polinizadores, mecanismos de polinização e sistemas de reprodução, a biologia reprodutiva desta orquídea é descrita para populações brasileiras. No sudeste do Brasil, *I. utricularioides* floresce de Julho a Outubro, produzindo de três a 194 flores por inflorescência. A espécie é polinizada exclusivamente por abelhas, que visitam a flor em busca de néctar. Como o cálcio presente no labelo não produz néctar, as flores são polinizadas por engano e operam como um mimico generalista de alimento. O polinário fica aderido à porção dorsal da probóscide das abelhas, quando elas inserem sua cabeça dentro da flor buscando por néctar. Os tratamentos de polinização manual revelaram que as populações brasileiras de *I. utricularioides* são autoincompatíveis, e produzem menos frutos que as populações caribenhas em condições naturais. No entanto, os frutos possuem 99% de sementes potencialmente viáveis. De acordo com a Lei de Baker, organismos autocompatíveis são favorecidos pela seleção natural em ambientes isolados, como ilhas. Considerando um evento de dispersão associado a um efeito *bottleneck*, um pequeno número de indivíduos autocompatíveis de *I. utricularioides* pode ter sido selecionado ao colonizar a ilha de Porto Rico. Ainda, o sistema generalista de polinização encontrado para a espécie pode explicar como essa orquídea atingiu tão ampla distribuição.

Palavras-chave: Epidendroideae – biologia floral – engano de alimento – Oncidiinae – biologia da polinização.

Abstract

Ionopsis utricularioides (Sw.) Lindl. is a widespread epiphytic orchid occurring from Florida to South America. It is widely known for decades that the species is rewardless, but the identity of its pollinators never was mentioned elsewhere. In Puerto Rico the species is self-compatible and the fruit set in its natural conditions is low. Based on the data on reproductive phenology, pollinators, pollination mechanism and breeding system, the reproductive biology of this orchid species was studied in Brazilian populations. In the southeastern Brazil, *I. utricularioides* flowers from July to October, producing 3-194 flowers per inflorescence. The species is pollinated exclusively by bees, which visit the flowers by searching the floral nectar. As the spur-like nectary is dry, the flowers are pollinated by deceit and operate as a generalized food mimic. The pollinarium is attached on the dorsal portion of the proboscis of bees, while they put their head inside the flowers during nectar foraging. The experimental manipulations for record the breeding system revealed that Brazilian populations of *I. utricularioides* are self-incompatible and produce less fruits than those in Puerto Rico in natural conditions. However, the fruits possess 99% of potentially viable seeds. According to Baker's Law, there is reinforcement for self-compatible populations in isolated environments such as islands. Considering a dispersal event associated with bottleneck effect, a small number of self-compatible individuals of *I. utricularioides* could have been favored by natural selection in colonizing the Caribbean island. In addition, the nonspecific pollination system found here can explain how this orchid reached such widespread distribution.

Key words: Epidendroideae, floral biology, food deception, Oncidiinae, pollination biology.

Introdução

A polinização das orquídeas tem intrigado biólogos por décadas (Darwin 1862, van der Pijl & Dodson 1966, Micheneau *et al.* 2009). Ao longo dos anos, pesquisadores descreveram vários mecanismos de polinização envolvendo principalmente abelhas (van der Pijl & Dodson 1966), mas também outros insetos (Aguiar *et al.* 2012, Pansarin & Pansarin 2013), beija-flores (Singer & Sazima 2000) e roedores (Wang *et al.* 2008) como polinizadores.

Cerca de um terço das espécies de orquídeas são polinizadas por engano (Ackerman 1986), o que ocorre quando os polinizadores não são capazes de distinguir entre flores com e sem recursos (Renner 2006, Pansarin *et al.* 2008). O engano generalizado de alimento é o mecanismo mais comum de engano que pode ser encontrado em Orchidaceae (Jersáková *et al.* 2006) e, uma vez que orquídeas polinizadas por engano não apresentam recursos florais, as visitas de polinizadores à essas espécies são escassas e, por consequência, formam menos frutos na natureza que aquelas que oferecem recursos de polinização aos seus polinizadores (Neiland & Wilcock 1998, Tremblay *et al.* 2005).

Ionopsis utricularioides (Sw.) Lindl. é uma orquídea de ampla distribuição, ocorrendo da Flórida até a América do Sul (Ackerman 1995). De acordo com Montalvo & Ackerman (1987), essa espécie é polinizada por engano em Porto Rico, uma vez que suas flores não possuem recursos de polinização. No entanto, seus polinizadores na ilha são desconhecidos. Além disso, em Porto Rico as plantas de *I. utricularioides* formam poucos frutos em condições naturais e suas flores são autocompatíveis (Montalvo & Ackerman 1987).

Espécies de plantas de ampla abrangência podem apresentar diferenças em seus aspectos reprodutivos ao longo de sua distribuição. Variações no sistema de reprodução são ainda mais evidentes quando comparadas populações continentais e insulares (Baker 1967). Na orquídea *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl., foi encontrada variação nas taxas de frutificação quando comparadas populações brasileiras e caribenhas (Aguiar *et al.* 2012). A Lei de Baker declara que quando o serviço de polinização é incerto, grupos de plantas que mudam para autocompatibilidade, ou até mesmo autogamia, ao longo da evolução, possuem maior probabilidade de serem favorecidas pela seleção natural (Baker 1955, 1967). Apesar dessa afirmação ser controversa para alguns autores (Massol & Cheptol 2011), a Lei

de Baker pode manter sua utilidade preditiva quando é considerado um efeito *bottleneck* associado a um evento de dispersão, resultando em um número pequeno de colonizadores (Busch 2011).

Com base em dados sobre a fenologia reprodutiva, polinizadores, mecanismos de polinização e sistemas de reprodução, a biologia reprodutiva de *Ionopsis utricularioides* no Brasil é descrita neste estudo. Os resultados obtidos foram comparados com os dados presentes na literatura para populações de Porto Rico e discutidos levando em consideração a ampla distribuição da espécie.

Materiais e Métodos

Espécie de estudo

De acordo com Ackerman (1995), Pansarin & Pansarin (2010) e Aguiar *et al.* (in prep.), os indivíduos de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. são caracterizados como plantas epífitas, pequenas e cespitosas, com numerosas raízes. Os pseudobulbos são inconspícuos, geralmente cobertos pelas folhas. As inflorescências laterais podem atingir até 80 cm de comprimento apresentando poucas ou muitas flores, de acordo com o tamanho da planta. As flores variam do rosa pálido ao violeta e são ressupinadas, possuindo de 5 a 11 mm de comprimento. As sépalas laterais são unidas no pé da coluna, formando um pequeno calcar. As pétalas são oblongas e obtusas. O labelo é 3-lobado, com protuberâncias entre os lobos laterais. A coluna é curta (1,5 – 2 mm de comprimento) e mais larga na região do estigma. As polínias amarelas são globosas e os frutos são cilíndricos.

Locais de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Ribeirão Preto (21°10' S, 47°48' O), SP, Brasil, com plantas cultivadas no Orquidário LBMBP (Orquidário do Laboratório de Biologia Molecular e Biossistemática de Plantas), da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As plantas foram coletadas em duas pequenas populações ocorrendo em matas de galeria alagadas nos municípios de Pradópolis (21° 21' S, 48° 03' O) e Dobrada (21° 31' S, 48° 23' O), e em uma população em uma área paludosa aberta na cidade de Serra Azul (21° 30' S, 47° 56'

O). Todas essas cidades pertencem à região de Ribeirão Preto e compartilham um clima classificado como “Cwa”, i.e., mesotérmico com uma estação seca de inverno (Köppen 1948). A região é caracterizada como um ecótono entre a Mata Atlântica e o Cerrado (Pinto 1989, Kronka *et al.* 1993).

Fenologia reprodutiva e teste com vermelho neutro

A fenologia reprodutiva foi estudada durante os períodos de floração de 2012 e 2013. Foram coletados dados a respeito da produção de pseudobulbos e inflorescências, período de antese, longevidade das flores e deiscência dos frutos. Para determinar o tempo de vida das flores, 30 flores (duas plantas; duas inflorescências) foram conferidas diariamente durante o período de floração de 2013.

Cinco flores frescas de cinco plantas diferentes foram cortadas longitudinalmente, de forma que o lúmen do cálcxar ficasse exposto. As flores foram, então, imersas em solução aquosa de vermelho neutro 0,1% (m/v), para avaliar se existe atividade metabólica intensa na epiderme do cálcxar (Dafni 1992), verificando se existiria produção de néctar no local.

Visitantes florais e processo de polinização

Durante o período de floração de 2012, observações de campo foram realizadas na população de Serra Azul (área aberta paludosa), durante 2 e 3 de Agosto, das 9:00 às 16:00 h, 8 e 9 de Agosto, das 9:00 às 15:00 h, 10 de Agosto, das 9:00 às 13:00 h, 14 a 17 de Agosto, das 9:00 às 15:00 h, e 20 de Agosto, das 9:00 às 14:00 h, totalizando 59h de observações. Durante o período de floração de 2013, as observações foram realizadas no jardim do Orquidário LBMBP, em Ribeirão Preto, de 30 de Julho a 1º de Agosto, das 8:00 às 16:00 h, 2 de Agosto, das 9:00 às 12:00 h, 6 de Agosto, das 8:00 às 16:00 h, e 8 de Agosto, das 13:00 às 16:00, totalizando 38h de observações. Desta forma, ao todo foram realizadas 97h de observações ao longo dos dois períodos de floração.

Os visitantes florais foram fotografados com câmera digital e coletados com rede entomológica. Detalhes dos polinizadores foram fotografados em um estereomicroscópio Stereozoom Leica S8 APO, e analisados com o software de imagens IM50. Os insetos coletados foram identificados e armazenados como

vouchers na “Coleção Camargo” (RPSP) do Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Sistemas de reprodução

Os sistemas de reprodução de *Ionopsis utricularioides* foram investigados em 54 plantas mantidas em vasos comunitários no Orquidário LBMBP (Col. J.M.R.B.V. Aguiar LBMBM 450, LBMBP 455, LBMBP 456). Quatro diferentes tratamentos manuais foram realizados: autopolinização manual (n = 30 flores, 10 inflorescências, 10 plantas), autopolinização espontânea (n = 30 flores, 10 inflorescências, 10 plantas), polinização cruzada (n = 77 flores, 24 inflorescências, 24 plantas) e emasculação (n = 30 flores, 10 inflorescências, 10 plantas). O tratamento de polinização cruzada foi realizado usando plantas de diferentes populações. As flores foram manipuladas no primeiro dia de antese.

As taxas de frutificação foram obtidas para todos os tratamentos realizados, assim como para indivíduos mantidos como controle na mata de galeria e na área aberta paludosa (n = 30 e 37 indivíduos, respectivamente), e os resultados obtidos foram comparados com os dados disponíveis para populações de Porto Rico (Montalvo & Ackerman 1987). De cada fruto formado nos tratamentos manuais, assim como para os frutos formados em condições naturais, foram analisadas 200 sementes para quantificar a porcentagem de sementes potencialmente viáveis, de acordo com a presença ou ausência de embrião.

Resultados

Fenologia reprodutiva e teste com vermelho neutro

Nas populações estudadas de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. as plantas começaram a produzir novas inflorescências em Maio e as primeiras flores abrem ao final de Julho. O pico de floração ocorre em Agosto e o período de floração termina no começo de Outubro. Em condições naturais cada inflorescência produz de três a 194 flores, que abrem ao longo do dia. Flores não polinizadas duram até 25 dias e a deiscência dos frutos ocorre aproximadamente quatro meses após a polinização, mesmo período em que um novo pseudobulbo é formado.

O teste de vermelho neutro revelou que a epiderme do lúmen do cálcar não apresenta atividade metabólica evidente (Fig. 1A-B), indicando que não há produção de néctar no local. Ainda, os cortes longitudinais revelaram que o cálcar é inacessível aos polinizadores, uma vez que sua entrada é fechada a partir do labelo (Fig. 1A).

Visitantes florais e processo de polinização

Durante as observações ao longo do período de floração de 2012, na população de Serra Azul, apenas uma visita de uma abelha Meliponini não identificada foi registrada. Além disso, outra abelha Meliponini, *Nannotrigona testaceicornis* (Lepeletier), foi coletada com um polinário de *Ionopsis utricularioides* aderido à probóscide. Essa abelha foi capturada enquanto coletava pólen nas flores de um indivíduo de *Hedyosmum brasiliense* Miq. (Chloranthaceae), que é um dos forófitos da espécie de estudo na área. Porém, durante as observações na cidade de Ribeirão Preto (período de floração de 2013), 27 visitas de abelhas foram registradas (Tabela 1) e ao menos oito remoções de polinários ocorreram ao longo das observações. As visitas ocorreram durante o dia e foram mais frequentes entre as 10:00 e 15:00 h. Em todas as visitas as abelhas pousaram no labelo e seguiram os guias de néctar até a sua base, inserindo a cabeça dentro da flor, entre o labelo e a coluna (Fig. 1C,E). Enquanto procuravam por néctar, as abelhas tocavam o viscidio com a porção dorsal da probóscide, removendo o polinário. Cada abelha visitou de uma a cinco flores por inflorescência e as visitas duraram de um a oito segundos.

Muitas espécies de abelhas foram registradas como visitantes florais de *Ionopsis utricularioides* no período de floração de 2013 (Tabela 1), mas apenas *Paratetrapedia flaveola* (Aguiar & Melo), *Ceratina* sp. (Latreille), *Paratrigona lineata* (Lepeletier) e *Augochlora* sp. (Smith) podem ser consideradas polinizadores dessa espécie de orquídea, levando em consideração a remoção do polinário. Em *P. flaveola* e *Ceratina* sp. foram encontrados mais de um viscidio e/ou polinário aderidos à probóscide (Fig. 1D,F), indicando que esses indivíduos realizaram várias visitas efetivas às flores de *I. utricularioides*.

Sistemas de reprodução e frutificação natural

Nas flores em que foi realizado o tratamento de polinização cruzada, a taxa de frutificação foi de 55,84%. No entanto, as flores emasculadas, intactas (ensacadas) e autopolinizadas manualmente não formaram frutos, indicando que as populações de *Ionopsis utricularioides* do sudeste brasileiro são completamente autoincompatíveis. Sob condições naturais, a taxa de frutificação foi de 5,35% na área aberta paludosa e de 0,58% dentro da mata de galeria. Muitas plantas não formaram frutos em seu habitat natural (48,65% na área paludosa e 83,33% na mata de galeria). A Tabela 2 mostra todos os resultados obtidos a partir deste estudo, fazendo uma comparação com os dados previamente apresentados para populações de Porto Rico.

A porcentagem de sementes potencialmente viáveis nos frutos provenientes do tratamento de polinização cruzada e da frutificação natural exibiram variação irrelevante, e apresentaram cerca de 99% de sementes potencialmente viáveis.

Discussão

Apesar de *Ionopsis* Kunth ser um gênero de ampla distribuição, pouco se sabe sobre os seus polinizadores e biologia reprodutiva. De acordo com Roubik (2000), *Trigona fulventris* (Gérin) (Hymenoptera: Meliponini) foi coletada com um polinário de uma *Ionopsis* não identificada, não deixando evidente os detalhes da polinização da espécie. Assim, a presente investigação é o primeiro estudo relatando os polinizadores de uma espécie de *Ionopsis*, descrevendo em detalhes o processo de polinização de *I. utricularioides* (Sw.) Lindl., que é polinizada por abelhas sociais e solitárias no sudeste brasileiro.

Hymenoptera é considerado o mais importante grupo de polinizadores de Orchidaceae, os quais buscam nas flores de orquídeas néctar, óleos comestíveis, fragrâncias e outros recursos de polinização (van der Pijl & Dodson 1966). Além disso, muitas orquídeas polinizadas por engano são polinizadas pelas espécies de Hymenoptera (e.g., Pansarin *et al.* 2008, Vale *et al.* 2011, Pansarin *et al.* 2013).

O teste com vermelho neutro revelou que não existe secreção de néctar no cálcio dessa espécie de orquídea. No entanto, a presença de um cálcio pode ser importante nos processos de polinização por engano, juntamente com o padrão de coloração e a presença de guias de néctar (Jersáková *et al.* 2006). Ainda, Aguiar *et al.*

(in prep.) mostra que, no Brasil, as flores de *I. utricularioides* possuem muitos compostos químicos fragrantos, produzidos pelos osmóforos no labelo, que também podem estar relacionados à atração dos polinizadores, uma vez que alguns dos componentes da fragrância dessa espécie também estão presentes em outras espécies polinizadas por abelhas. Assim, em *I. utricularioides* os polinizadores são atraídos por meio de um mecanismo de engano generalizado de alimento, já que suas flores não possuem recursos florais e apresentam sinalizações típicas de flores produtoras de néctar (Jersáková *et al.* 2006), enganando abelhas que forrageiam em busca desse recurso.

Orquídeas que apresentam o mecanismo de engano generalizado de alimento tendem a ser menos específicas em relação aos seus polinizadores, compartilhando os mesmos com várias outras plantas que crescem simpatricamente (Cozzolino & Widmer 2005, Schiestl & Schlüter 2009). *Ionopsis utricularioides* parece se encaixar nessa premissa, uma vez que apresenta várias espécies de abelhas como visitantes florais e ao menos quatro destas como polinizadores. No entanto, em *Cyrtopodium flavum* (Nees) Link & Otto ex Rchb.f., outra orquídea brasileira que apresenta um mecanismo de engano de alimento (Pansarin *et al.* 2008; como *C. polyphyllum* (Vell.) Pabst ex F.Barros), foi encontrado um espectro restrito de polinizadores, já que apenas espécies de *Centris* (Fabricius) (Hymenoptera: Apidae) polinizam essa orquídea. Neste caso, as flores apresentam um mimetismo Batesiano, juntamente à produtora de óleo *Stigmaphyllon arenicola* C.E. Anderson (Malpighiaceae), e, assim, são encontradas apenas abelhas coletoras de óleo visitando as flores de ambas as espécies. No caso de *I. utricularioides* não existe um modelo de mimetismo específico, o que explica o fato de terem sido encontradas diversas espécies de abelhas, de grupos não relacionados, visitando as flores dessa orquídea.

Além dos atrativos florais, orquídeas polinizadas por engano de alimento também podem se beneficiar de plantas produtoras de recurso que crescem na mesma comunidade e atuam como imãs de polinizadores. Em *Anacamptis morio* (L.) Bateman, Pridgeon & M.W. Chase, uma orquídea polinizada por mamangavas, a presença de plantas produtoras de néctar aumenta significativamente as visitas de polinizadores às suas flores (Johnson *et al.* 2003). Na área aberta paludosa, onde apenas uma visita de abelha à *I. utricularioides* foi registrada, existiam poucas plantas produtoras de néctar florindo durante as observações de campo deste estudo. No entanto, no jardim em Ribeirão Preto existem muitas plantas cultivadas que possuem

pólen e néctar como recurso, incluindo *Streptosolen jamesonii* Miers (Solanaceae) que floresce vigorosamente ao mesmo tempo que *I. utricularioides* e produz néctar em abundância (Schuel 1961). Além disso, muitas das espécies de abelhas que visitaram as flores de *I. utricularioides* foram vistas coletando pólen e néctar nas flores de *S. jamesonii*. Na área paludosa, a única abelha coletada com polinário da orquídea estudada estava forrageando por pólen nas flores de *Hedyosmum brasiliense* Miq., que também deve atuar como uma planta imã nesse ambiente. Apesar de não existir qualquer semelhança entre as flores das plantas imãs e as flores de *I. utricularioides*, assim como ocorre no caso de *A. morio* (Johnson *et al.* 2003), as abelhas atraídas pelas plantas produtoras de recursos florais se enganam enquanto forrageiam por outras fontes de recursos, visitando as flores de *I. utricularioides* por engano. Assim, a presença de mais plantas imãs no jardim em Ribeirão Preto pode explicar a maior frequência de visitas registradas durante o período de floração de 2013.

Ionopsis utricularioides apresentou uma alta porcentagem de sementes potencialmente viáveis (99%), o que é incomum para Epidendroideae, cujas espécies geralmente possuem várias sementes sem embriões (Lock & Profita 1975, Stort & Martins 1980, Borba *et al.* 2001, Borba & Braga 2003, Pansarin & Pansarin 2013). Porém, algumas espécies de Epidendroideae apresentam porcentagens de sementes potencialmente viáveis acima de 90%, como *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (González-Díaz & Ackerman 1988), *Trichocentrum pumilum* (Lindl.) M.W. Chase & N.H. Williams (Pansarin & Pansarin 2011) e *Acampe rígida* (Buch-Ham ex Sm.) P.F. Hunt (Fan *et al.* 2012).

Os resultados de frutificação natural mostraram que existe certa variação na biologia reprodutiva de *Ionopsis utricularioides* de acordo com o habitat em que a espécie está inserida. Na área aberta paludosa, as plantas apresentaram uma taxa de frutificação quase nove vezes maior que as plantas da mata de galeria. Isso indica que, provavelmente, os polinizadores são mais abundantes na área palustre que na mata de galeria.

Além disso, foi encontrada uma grande diferença no sistema de reprodução quando comparadas as populações de *Ionopsis utricularioides* do sudeste brasileiro e de Porto Rico. Neste estudo, foi mostrado que no Brasil as plantas são autoincompatíveis e a taxa de frutificação natural atingiu um máximo de 5,25%. Na ilha caribenha, as flores são autocompatíveis e, na metade do período de floração, a

frutificação natural era de 7,20% (Montalvo & Ackerman 1987). Os autores ainda relataram que até o final do período de floração em Porto Rico a taxa de frutificação natural poderia dobrar o seu valor. Analisando 447 espécies de plantas, Sutherland (1986) encontrou que plantas autocompatíveis possuem uma taxa de frutificação significativamente maior que espécies autoincompatíveis. Ainda, apesar de uma baixa frutificação ser geralmente relacionada à escassez de polinizadores em orquídeas (Neiland & Wilcock 1998, Tremblay *et al.* 2005, Mickeliunas *et al.* 2006), isso pode ser também uma consequência da autoincompatibilidade (Pansarin & Pansarin 2011). Na orquídea autoincompatível *Coelogyne fimbriata* Lindl., a deposição de polínias ocorre em 69,5% das flores, mas a taxa de frutificação é sempre menor que 10%, indicando que a sua autoincompatibilidade está realmente relacionada à baixa taxa de frutificação, uma vez que a maioria das deposições de polínias são geitonogâmicas (Cheng *et al.* 2009). Assim, a autocompatibilidade em Porto Rico pode também permitir que as plantas de *I. utricularioides* produzam mais frutos que no Brasil, onde a espécie é autoincompatível.

A Lei de Baker declara que a seleção natural favorece populações autocompatíveis em ambientes insulares, quando comparamos as suas biologias reprodutivas com as de populações continentais (Baker 1955, 1967). Stebbins (1975) mostrou que tal premissa também é plausível para outros tipos de ambientes isolados, como topos de montanhas. Ele dá o exemplo das gramíneas *Secale montanum* Guss. e *S. africanum* Stapf., que são dificilmente distinguíveis morfologicamente e estão isoladas uma da outra, visto que *S. africanum* está confinada a uma cadeia de montanhas da África do Sul. No entanto, híbridos artificiais das duas espécies são viáveis e a característica mais distinta entre elas é que *S. africanum* é autocompatível, enquanto que *S. montanum* é autoincompatível. Para espécies autógamas, a colonização de ambientes isolados é ainda mais facilitada, uma vez que elas não dependem de polinizadores bióticos. *Oeceoclades maculata* é uma orquídea de ampla distribuição que ocorre tanto em ambientes insulares quanto continentais (Ackerman 1995). Essa espécie apresenta um sistema misto de reprodução composto por polinização cruzada realizada por borboletas e autogamia mediada pela chuva (Aguilar *et al.* 2012) e isso provavelmente está relacionado como seu sucesso em colonizar ambientes novos e isolados.

O argumento de Busch (2011) a respeito da Lei de Baker leva à inferência de que um evento de dispersão aliado à um efeito *bottleneck* pode ter favorecido a

colonização da ilha de Porto Rico por plantas autocompatíveis de *Ionopsis utricularioides*. A partir disso, e considerando a efetiva relação entre essa espécie de orquídea e seus fungos micorrizos (Otero *et al.* 2007) aliada aos resultados encontrados aqui relacionados ao uso de um mecanismo efetivo de polinização por engano generalizado de alimento – e um diverso espectro de polinizadores – é possível compreender como essa espécie de orquídea consegue manter sua ampla distribuição geográfica.

Agradecimentos específicos

Os autores agradecem Nielson A. P. Salvador (Universidade de São Paulo) pela colaboração na coleta das plantas, Paulo R. de M. Cabral (Universidade de São Paulo) pela contribuição com o trabalho de campo e Dra. Silvia R. de M. Pedro (Universidade de São Paulo) por identificar os polinizadores. Os autores também agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento.

Referências Bibliográficas

- Ackerman J.D. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1: 108-113.
- Ackerman J.D. 1995 *An orchid flora of Puerto Rico and the Virgin Islands*. NYBG, New York.
- Aguiar J.M.R.B.V., Pansarin L.M., Ackerman J.D., Pansarin E.R. 2012. Biotic versus abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae). *Plant Spec Biol* 27: 86-95.
- Baker H.G. 1955. Self-compatibility and establishment after ‘long-distance’ dispersal. *Evolution* 9: 347-349.
- Baker H.G. 1967 Support for Baker’s law – as a rule. *Evolution* 21: 853-856.
- Borba E.L., Braga P.I.S. 2003. Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Braz J Bot* 26: 541-549.

- Borba E.L., Semir J., Sheperd G.J. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Ann Bot-London* 88: 89-99.
- Busch J.W. 2011. Demography, pollination, and Baker's Law. *Evolution* 65: 1511-1513
- Cheng J., Shi J., Shangguan F.Z., Dafni A., Deng Z.H., Luo Y.B. 2009 Pollination of a self-incompatible, food-mimic orchid *Coelogyne fimbriata* (Orchidaceae), by female *Vespula* wasps. *Ann Bot-London* 104: 565-571.
- Cozzolino S., Widmer A. 2005 Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends Ecol Evol* 20: 487-494.
- Dafni A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Darwin C. 1862. *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effect of intercrossing*. John Murray, London.
- Fan X.L., Barret S.C.H., Lin H., Chen L.L., Zhou X., Gao J.Y. 2012. Rain pollination provides reproductive assurance in a deceptive orchid. *Ann Bot-London* 110: 953-958.
- González-Díaz N., Ackerman J.D. 1988. Pollination, fruit set and seed production in the orchid *Oeceoclades maculate*. *Lindleyana* 3: 150-155.
- Jersáková J., Johnson S.D., Kindlmann P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biol Rev* 81: 219-235.
- Johnson S.D., Peter C.I., Nilsson A., Ågren J. 2003. Pollination success in a deceptive orchid enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology* 84: 2919-2927.
- Köppen W. 1948. *Climatologia*. Ed. Fondo de Cultura e Economia, México.
- Kronka F.J.M., Matsuma C.K., Nalon M.A., Cali I.H.D., Rossi M., Mattos I.F.A., Shin-ike M.S., Portinhas A.A.S. 1993. *Inventário florestal do Estado de São Paulo*. Instituto Florestal de São Paulo, São Paulo.
- Lock J.M., Profita J.C. 1975. Pollination of *Eulophia cristata* (Sw.) Steud. (Orchidaceae) in Southern Ghana. *Acta Bot Neerl* 24: 135-138.
- Massol F., Cheptou P.O. 2011. When should we expect the evolutionary association of self-fertilization and dispersal? *Evolution* 65: 1217-1220.

- Micheneau C., Johnson S.D., Fay M.F. 2009. Orchid pollination: from Darwin to the present day. *Bot J Linn Soc* 161: 1-19.
- Mickeliunas L., Pansarin E.R., Sazima M. 2006. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). *Braz J Bot* 29: 251-258.
- Montalvo A.M., Ackerman J.D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* 19: 24-31.
- Neiland M.R., Wilcock C.C. 1998. Frit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *Am J Bot* 85: 1657-1671.
- Otero J.T., Flanagan N.S., Herre E.A., Ackerman J.D., Bayman P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Am J Bot* 94: 1944-1950.
- Pansarin E.R., Aguiar J.M.R.B.V., Pansarin L.M. 2013. Floral biology and histochemical analysis of *Vanilla edwallii* Hoehne (Orchidaceae: Vanilloideae): an orchid pollinated by Epicharis (Apidae: Centridini). *Plant Spec Biol*. doi: 10.1111/1442-1984.12014.
- Pansarin E.R., Pansarin L.M. 2010. *The family Orchidaceae in the Serra do Japi, São Paulo State, Brazil*. SpringerWienNewYork, Vienna.
- Pansarin E.R., Pansarin L.M. 2011. Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-collecting bees. *Plant Biol* 13: 576-581.
- Pansarin E.R., Pansarin L.M. 2013. Reproductive biology of *Epidendrum tridactylum* (Orchidaceae: Epidendroideae): a reward-producing species and its deceptive flowers. *Plant Syst Evol*. doi:10.1007/s00606-013-0884-9.
- Pansarin L.M., Pansarin E.R., Sazima M. 2008. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. *Plant Biol* 10: 650-659.
- Pinto M.M. 1989. *Levantamento fitossociológico de uma mata residual: Campus de Jaboticabal da UNESP*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Renner S.S. 2006. Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. In: Waser NM, Orleton J (eds) *Plant-Pollinator Interactions From Specialization to Generalization*, 1st edn. The University of Chicago Press, Chicago, pp: 123-144.

- Roubik D.W. 2000. Deceptive orchids with Meliponini as pollinators. *Plant Syst Evol* 222: 271-279.
- Schiestl F.P., Schlüter P.M. 2009. Floral isolation specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. *Annu Rev Entomol* 54: 425-446.
- Shuel R.W. 1961 Influence of reproductive organs on secretion of sugars in flowers of *Streptosolen jamesonii*, Miers. *Plant Physiol* 36: 265-271.
- Singer R.B., Sazima M. 2000. The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet) L.C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in southeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 223: 221-227.
- Stebbins G.L. 1957. Self fertilization and population variability in the higher plants. *Am Nat* 91 :337-354.
- Stort M.N.S., Martins P.S. 1980. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciência e Cultura* 32: 1080-1084.
- Sutherland S. 1986. Patterns of fruit-set: what controls fruit-flower ratios in plants? *Evolution* 40: 117-128.
- Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Bot J Linn Soc* 84: 1-54.
- Vale A., Navarro L., Rojas D., Álvarez J.C. 2011. Breeding system and pollination by mimicry of the orchid *Tolumnia guibertiana* in Western Cuba. *Plant Spec Biol* 26: 163-173.
- van der Pijl L., Dodson C.H. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables.
- Wang Y., Zhang Y., Ma X. & Dong L. 2008. The unique mouse-pollination in an orchid species. *Nature Proceedings*: hdl: 10101/npre. 1824.1

Tabela 1: Visitantes florais e polinizadores (*) de *Ionopsis utricularioides*, registrados no período de floração de 2013.

Espécies	Número de visitas	Polinizador
Apidae		
Apini		
<i>Apis mellifera scutellata</i> (Lepeletier)	1	-
Bombini		
<i>Bombus</i> sp.	1	-
Ceratinini		
<i>Ceratina</i> sp.	6	*
<i>Ceratinula</i> sp.	1	-
Meliponini		
<i>Paratrigona lineata</i> (Lepeletier)	5	*
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius)	2	-
Tapinotaspidini		
<i>Paratetrapedia flaveola</i> (Aguiar & Melo)	6	*
Halictidae		
Augochlorini		
<i>Augochlora</i> sp.	5	*

Tabela 2: Resultados de frutificação obtidos pelos tratamentos realizados em populações de *Ionopsis utricularioides* do sudeste brasileiro, comparados com os dados apresentados para populações de Porto Rico. Os valores entre parênteses são frutos/flores.

Tratamentos	Taxa de Frutificação (%)	
	Sudeste brasileiro	Porto Rico*
Polinização cruzada	55,84 (43/77)	89,70 (61/68)
Autopolinização manual	0 (0/30)	88,70 (55/62)
Autopolinização espontânea	0 (0/30)	-
Emasculação	0 (0/30)	-
Frutificação natural	Área paludosa – 5,25 (72/1.371)	7,20 (20/276)
	Mata de galeria – 0,58 (7/1.190)	

* Baseado em Montalvo & Ackerman (1987).

Figura 1: Flores e polinizadores de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. A: Corte longitudinal da flor de *I. utricularioides*, corado com vermelho neutro. A seta mostra que a entrada do cálcx é fechada. B: Detalhe do nectário corado com vermelho neutro, indicando que a epiderme do lúmen não apresenta atividade metabólica intensa. C: *Ceratina* sp. visitando flor de *I. utricularioides*. D: *Ceratina* sp. portando dois polinários (cabeças de seta) na porção dorsal da probólide. E: *Paratetrapedia lineata* visitando flor de *I. utricularioides*. F: *Paratetrapedia lineata* com polinários (seta). No detalhe, é possível visualizar três vicídios (cabeças de seta) indicando múltiplas visitas às flores. Barras de escala: A, D, F: 2 mm. B: 1mm. C: 5mm. E: 10mm.

Figura 1

Considerações Finais

O estudo de anatomia floral e histoquímica das duas espécies de *Ionopsis* que ocorrem no Brasil revelou que ambas apresentam osmóforos localizados nas protuberâncias encontradas entre os lobos laterais do labelo. Ambas as espécies produzem fragrâncias diferentes, mas apenas o aroma das flores de *I. satyrioides* pode ser facilmente percebido pelo nariz humano. *Ionopsis utricularioides* apresenta uma fragrância que só pode ser detectada na análise por GC-MS. Além disso, enquanto em *I. satyrioides* foram identificadas apenas as células epidérmicas das protuberâncias como produtoras de fragrâncias, em *I. utricularioides* também foram encontradas papilas secretoras na região próxima às protuberâncias. Ambas as espécies são polinizadas por engano. O estudo de biologia reprodutiva de *I. utricularioides* revelou que não existe produção de néctar no cálcio da flor. Já os estudos de da biologia floral até agora realizados para *I. satyrioides* mostram que também não existe néctar no cálcio dessa espécie.

Apesar da proximidade filogenética dos táxons estudados, a fragrância floral de cada uma apresenta componentes químicos diferentes, que não se repetem entre as espécies, mesmo quando são analisadas mais de uma população. Isso mostra que, para as *Ionopsis* do Brasil, a fragrância é um caráter taxonômico relevante na distinção das espécies. Aliás, existe a necessidade de uma revisão taxonômica do gênero, uma vez que ao menos *I. burchellii* é considerada como um sinônimo de *I. satyrioides* por alguns autores.

Ambas as espécies apresentam várias características visuais que provavelmente são os principais atrativos aos seus polinizadores, como coloração acentuada, guias de néctar – incluindo as protuberâncias amarelas do labelo – e a presença de cálcio. Além disso, ambas as espécies apresentam fragrâncias que, apesar de terem um papel aparentemente secundário na atração dos polinizadores, possuem componentes químicos conhecidos por sua capacidade em atrair abelhas polinizadores, principalmente aqueles encontrados em *I. utricularioides*. Estudos acerca da polinização de *Ionopsis satyrioides* estão sendo preparados, mas para *I. utricularioides* a polinização por abelhas já foi comprovada, uma vez que o este estudo revelou que ela é visitada e polinizada por várias espécies desse grupo de insetos.

Todos esses atributos florais, aliados à ausência de néctar e à grande diversidade de espécies de abelhas visitantes, permitem concluir que *Ionopsis utricularioides* é polinizada por engano generalizado de alimento, imitando características comuns às de flores produtoras de néctar, as flores de *I. utricularioides* atraem as abelhas, que acabam visitando várias flores em busca do recurso. Desta forma, abelhas foram capturadas com mais de um polinário ou viscidio, como ilustrado no segundo capítulo dessa dissertação.

Apesar dos polinizadores visitarem várias flores de uma mesma planta, a taxa de frutificação natural de *Ionopsis utricularioides* pode ser considerada baixa em relação à encontrada para outras orquídeas. Isso provavelmente está relacionado com o fato de as populações brasileiras estudadas serem autoincompatíveis, de forma que polinizações geitonogâmicas não resultam na formação de frutos. Em Porto Rico, as plantas estudadas na década de 80 mostraram-se autocompatíveis e apresentaram uma frutificação natural maior que a encontrada Brasil pelo estudo aqui apresentado. Essa diferença geográfica encontrada na biologia reprodutiva da espécie mostra a importância do estudo da polinização em diferentes áreas, principalmente nos extremos de ocorrência de uma espécie, principalmente para as de ampla distribuição, como é o caso de *I. utricularioides*. Estudos preliminares acerca dos sistemas de reprodução de *I. satyrioides* revelam que a espécie é autocompatível e apresenta taxa de frutificação natural maior que a encontrada para *I. utricularioides*.

As flores e a polinização das orquídeas tem intrigado pesquisadores há séculos e vários trabalhos já foram escritos mostrando a diversidade das flores, polinizadores e mecanismos de polinização em Orchidaceae. Atualmente, novas ferramentas vem sendo empregadas para compreender de forma cada vez mais aprofundada como as orquídeas se reproduzem e como a polinização está relacionada à evolução da família. Os trabalhos presentes nessa dissertação adicionam à essa literatura dados inéditos a respeito da biologia reprodutiva de *Ionopsis*. Estudos sobre a reprodução das plantas são imprescindíveis para a sua conservação, principalmente no Brasil onde a destruição de habitats é intensa. Para as orquídeas, em especial, ainda existem os abusos do extrativismo ilegal, uma vez que suas belas flores são muito almejadas para fins ornamentais.

Referências Bibliográficas

- Ackerman J.D. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1: 108-113.
- Ackerman J.D. 1995. *An orchid flora of Puerto Rico and the Virgin Islands*. v. 73. NYBG, New York.
- Aguiar J.M.R.B.V., Pansarin L.M., Ackerman J.D. & Pansarin E.R. 2012. Biotic vs. abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Plant Species Biology* 27: 86-95.
- Alrich P. & Higgins W. 2008. *The Marie Selby Botanical Gardens Illustrated Dictionary of Orchid Genera*. Cornell University Press, London.
- Baker H.G. 1967. Support for Baker's law – as a rule. *Evolution* 21: 853-856.
- Barros F. de, Vinhos F., Rodrigues V.T., Barberena F.F.V.A., Fraga C.N. & Pessoa E.M. 2014. Orchidaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000179>).
- Blanco M.A., Davies K.L., Stpiczyńska M., Carlsward B.S., Ionta G.M. & Gerlach G. 2013. Floral elaiophores in *Lockhartia* Hook. (Orchidaceae: Oncidiinae): their distribution, diversity and anatomy. *Annals of Botany* 112: 1775-1791.
- Campbell D.R. 1987. Interpopulational variation in fruit production: the role of pollination-limitation in the Olympic Mountains. *American Journal of Botany* 74: 269-273.
- Catling P.M. 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) L.C. Rich. (Orchidaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107: 525-529.
- Chase M.W., Hanson L., Albert V.A., Whitten W.M. & Williams N.H. 2005. Life history, evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95: 191-199.
- Cole F.R. & Firmage D.H. 1984. The floral ecology of *Platanthera blephariglottis*. *American Journal of Botany* 71: 700-710.
- Dressler R.L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland.
- Dressler R.L. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.

- Fay M.F. & Chase M.W. 2009. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany* 104: 359-364.
- Garay L.A. 1960. On the origin of the Orchidaceae. *Botanical Museum Leaflets of Harvard University* 19: 57-96.
- Hoehne F.C. 1949. *Iconografia das Orchidáceas do Brasil*. Secretaria da Agricultura, São Paulo.
- Jersáková J., Johnson S.D. & Kindlmann P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biologic Reviews* 81:219-235.
- Mondragón-Palomino M. & Theißen G. 2009. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. *Annals of Botany* 104: 583-594.
- Montalvo A.M. & Ackerman J.D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* 19: 24-31.
- Neiland M.R. & Wilcock C.C. 1998. Frit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657-1671.
- Nunes C.E.P., Castro M.D., Galetto L. & Sazima M. 2013. Anatomy of the floral nectary of ornithophilous *Elleanthus brasiliensis* (Orchidaceae: Sobralieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 764-772.
- Pansarin E.R., Aguiar J.M.R.B.V. & Pansarin L.M. 2013. Floral biology and histochemical analysis of *Vanilla edwallii* Hoehne (Orchidaceae: Vanilloideae): an orchid pollinated by *Epicharis* (Apidae: Centridini). *Plant Species Biology* in press.
- Pansarin E.R. & Amaral M.C.E. 2009. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea* Frost ex. Hook. *Flora* 204: 238-249.
- Pansarin E.R. & Pansarin L.M. 2011. Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-collecting bees. *Plant Biology* 13: 576-581.
- Pansarin E.R., Salatino A., Pansarin L.M. & Sazima M. 2012. Pollination systems in Pogonieae (Orchidaceae: Vanilloideae): A hypothesis of evolution among reward and rewardless flowers. *Flora* 12: 849-861.
- Pansarin L.M., Pansarin E.R. & Sazima M. 2008b. Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism. *Australian Journal of Botany* 56: 263-267.

- Pansarin L.M., Pansarin E.R. & Sazima M. 2008a. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. *Plant Biology* 10: 650-659.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N. 2009. *Genera Orchidacearum*, vol. 5, Epidendroideae (Part 2), Cymbidieae. Oxford University Press, London.
- Renner S.S. 2006. Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. In: Waser NM, Orleton J (eds) *Plant-Pollinator Interactions From Specialization to Generalization*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Roubik D.W. 2000. Deceptive orchids with Meliponini as pollinators. *Plant Systematics and Evolution* 222: 271-279.
- Singer R. B. & Koehler S. 2003. Notes on the pollination biology of *Notylia nemorosa* (Orchidaceae): do pollinators necessarily promote cross pollination? *Journal of Plant Research* 116: 19-25.
- Smith G.R. & Snow G.E. 1976. Pollination ecology of *Platanthera ciliares* and *P. Blephariglottis* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 137: 133-140.
- Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K. & Calvo R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54.
- van der Pijl L. & Dodson C.H. 1966. *Orchid flowers, their pollination and evolution*. University of Miami Press, Florida.
- Wang Y., Zhang Y., Ma X. & Dong L. 2008. The unique mouse-pollination in an orchid species. *Nature Proceedings*: hdl: 10101/npre. 1824.1